

MINISTERIE VAN LANDBOUW
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek — Gent

PROEFSTATION voor ZEEVISSERIJ

Oostende

(Direkteur : P. HOVART)

***De bepaling van de vluchtige
reducerende stoffen als objektieve
kwaliteitsmethode voor vis***

door

W. VYNCKE

MINISTERIE VAN LANDBOUW
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek — Gent

PROEFSTATION voor ZEEVISSERIJ

Oostende

(Direkteur : P. HOVART)



***De bepaling van de vluchtige
reducerende stoffen als objektieve
kwaliteitsmethode voor vis***

door

W. VYNCKE

I N L E I D I N G .

In een vorige publikatie (23) werd het probleem van de objektieve kwaliteitsbepaling van vis nader toegelicht en werden een zestal laboratoriummethoden bestudeerd, nl. de bepaling van de totale vluchtige basische stikstof van het visvlees en van het oogvocht, het trimethylamine, de pH, de brekingsindex van het oogvocht en de dektrische weerstand van het visweefsel.

In het buitenland - en vooral in de Verenigde Staten - wordt door meerdere onderzoekers grote waarde gehecht aan de bepaling van de vluchtige reducerende stoffen (VRS). Andere navorsers bekwamen met deze methode echter geen gunstige resultaten. Daar enerzijds uit oriënterende proeven naar voren gekomen was dat de VRS-bepaling wel een nuttige methode zou kunnen zijn en daar anderzijds zekere indikaties deden vermoeden dat minder gunstige resultaten het gevolg konden zijn van een niet volledig geschikte techniek, werd besloten de bepaling van de VRS aan een uitgebreid onderzoek te onderwerpen.

1. Principe.

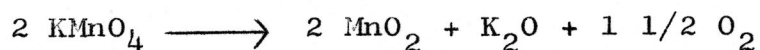
Het principe van de VRS-methode gelijk in wezen op dat van de reukwaarneming. Bij deze organoleptische waarneming, die één van de gevoeligste is om de versheidsstaat van vis vast te stellen, geven de reukstoffen (vluchtige bederfkomponenten) aan het reukorgaan een bepaalde stimulus die geregistreerd wordt door het centraal zenuwstelsel en toelaat een bepaald oordeel over de kwaliteit te vellen. In de VRS-methode worden de reukcomponenten door een luchtstroom meegevoerd en door een alkalische kaliumpermanganaatoplossing geleid. De vluchtige stoffen reduceren een deel van het purper kaliumpermanganaat (KMnO_4), dat een zeer actief oxydans is, in groen kaliummanganaat (K_2MnO_4). De graad van reductie vormt aldus een maatstaf voor de hoeveelheid reuk- of bederfkomponenten die aanwezig is. Met deze laboratoriummethode worden vele nadelen van de subjektieve organoleptische bepaling vermeden, o.m. beïnvloeding door uitwendige geuren, graad van receptiviteit van de keurder enz.

Er moet worden opgemerkt dat de VRS-methode een maatstaf is voor het gehele complex van de vluchtige reducerende reukcomponenten (aldehyden, ketonen, aminen, indol, dihydrogeensulfide, vluchtige zuren, alcoholen enz.) en niet één bepaalde verbinding (bv. trimethylamine) of klasse van verbindingen (bv. vluchtige zuren of basen) doseert. In dit verband vertoont de methode ook veel gelijkenis met de organoleptische reukwaarneming, die eveneens een globale indruk geeft van alle aanwezige reukcomponenten. Volgens Farber (7) zou juist hierin de grote waarde van de VRS-methode gelegen zijn.

De bepaling van de vluchtige reducerende stoffen (zoals trouwens de organoleptische reukwaarneming) is echter een empirische methode. Zij beoogt bv. niet een analytische dosering uit te voeren van de vluchtige stoffen die in een bepaald vismonster aanwezig zijn ; zij bepaalt enkel een deel van deze stoffen. De bekomen waarden zijn relatief en zijn enkel van betekenis als zij onder elkaar vergeleken worden (*). Dit veronderstelt echter strikt gelijke proefomstandigheden.

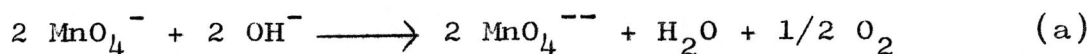
Een andere reden voor het werken onder strikt gelijke omstandigheden is gelegen in het speciaal karakter van de oxydo-reduktie met kaliumpermanganaat in alkalisch midden.

De algemene reactie is :



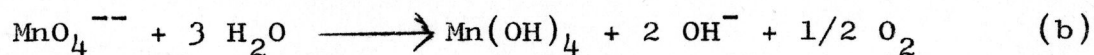
waarbij drie elektronen uitgewisseld worden.

Deze reactie grijpt echter in twee fazen plaats. De eerste faze verloopt snel bij kamertemperatuur :



Hierbij wordt één elektron uitgewisseld.

In de tweede faze wordt het gevormde manganaat gereduceerd volgens :



waarbij twee elektronen worden uitgewisseld.

(*) Voor vele methoden is dit geldig : bv. totale vluchtige basische stikstof, vluchtige zuren enz. ; bij anderen echter wordt een bepaalde verbinding in zijn totaliteit bepaald : bv. trimethylamine, ammoniak enz.

Deze reactie is uiterst traag en hangt van verschillende factoren af, o.m. concentratie, pH enz. (11). Volgens Holluta (10) zou reactie (b) slechts plaats grijpen nadat reactie (a) ten einde is. Onderzoekingen van Karel e.a. (11) zouden erop wijzen dat enkel de eerste fase kan gebruikt worden voor de kwantitatieve bepaling van vluchtige reducerende stoffen. Daar het bepalen van het overtollige KMnO_4 in zuur midden geschiedt (titratie met $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en hierbij vijf elektronen uitgewisseld worden ($\text{Mn}^{7+} \longrightarrow \text{Mn}^{2+}$), zou de reductie niet meer dan 20 % ($1/5$) mogen bedragen van de oorspronkelijke hoeveelheid KMnO_4 . Op te merken valt dat de totale reductie niet meer dan 60 % ($3/5$) kan bedragen.

Ook in het diffusieproces zelf is een reden te vinden voor het werken onder strikt gelijke proefomstandigheden. Het percentage vluchtige reducerende stoffen dat door een bepaald volume lucht wordt meegesleurd, is praktisch konstant en onafhankelijk van de concentratie aan vluchtige stoffen (12). Dit percentage hangt echter af van de vluchtigheid van de individuele stoffen : hoe kleiner de vluchtigheid, des te minder stoffen procentueel diffunderen. Het effect van de geringe vluchtigheid wordt echter relatief kleiner wanneer grotere volumeslucht gebruikt worden m.a.w. wanneer het pomp-debiet groter is. Zo diffunderen bv. respectievelijk 48 % aceton en 11 % ethanol, wanneer 5,6 liter lucht gebruikt worden, tegen respectievelijk 95 en 86 % voor 56 liter lucht (12).

2. Ontwikkeling van de methode en literatuuroverzicht.

De VRS-methode werd reeds een veertigtal jaren geleden voor diverse voedingswaren voorgesteld. In 1937 waren Strohecker e.a. de eersten om de methode op vis toe te passen (18). De vluchtige stoffen werden echter niet door lucht, maar

door stoom meegevoerd, zodat men feitelijk van "waterdampvluchtige reducerende stoffen" zou moeten spreken. Het nadeel van deze techniek is echter dat bepaalde warmtelabiele componenten door de stoom kunnen ontbonden worden en vluchtige reducerende verbindingen geven die de bepaling kunnen beïnvloeden. De eerder uiteenlopende resultaten die met deze techniek werden geboekt zouden hierop wijzen (8).

Het gebruik van lucht als draaggas werd voor het eerst door Lang e.a. (12) voorgesteld. Deze auteurs maakten gebruik van een continue luchtstroom die eerst door het vismonster (vissap) en dan door de oxyderende oplossing gepompt werd. Zij beproefden daarbij talrijke oxydantia en stelden vast dat een alkalische kaliumpermanganaatoplossing de beste resultaten gaf en dit met een brede spektrum verbindingen waarvan kan worden verwacht dat zij in bedervende vis aanwezig zijn. Er valt te noteren dat ammoniak hier een belangrijke uitzondering op uitmaakt ; het reduceert het kaliumpermanganaat niet.

In 1956 verbeterden Farber en Lerro (3) de methode aanzienlijk door een kompakte apparatuur te gebruiken en de lucht in gesloten kringloop te laten cirkuleren achtereenvolgens door het te onderzoeken monster en de oxyderende oplossing. Sedertdien onderging de methode slechts lichte wijzigingen. In talrijke publikaties wezen Farber en medewerkers (2) (4) (5) (6) op het nut van de VRS-methode en dit voor een uitgebreide gamma verse, diepbevroren, gerookte, gezouten, gedroogde, ingeblikte vis, schaal- en weekdieren. Moorjani e.a. (14), Wittfogel e.a. (27) (28), Suzuki (19) boekten eveneens gunstige resultaten met diverse vissen. Verschillende onderzoekers, waaronder Riemann (14), Velankar (22), Schmidt en Mayoh (15), Stansby e.a. (17) en Shewan (16) zijn echter van

mening dat de methode ofwel niet betrouwbaar genoeg is, ofwel geen bijzondere voordelen biedt t.o.v. andere methoden zoals bv. de trimethylamine-dosering.

3. Modus operandi.

3.1. Apparatuur.

De door Farber (3) voorgestelde apparatuur werd beproefd ; na een aantal oriënterende experimenten werden echter enkele kleine wijzigingen doorgevoerd. De apparatuur (figuren 1 en 2) bestaat essentieel uit een aëratievat, waarin het te onderzoeken monster vissap of visextrakt gebracht wordt, en een reaktievat met de alkalische permanganaatoplossing. Als aëratievat wordt een rondbodemkolf van 1 liter gebruikt die onderaan voorzien is van een buis van 14 cm lengte en 2 cm diameter. Bovenaan bevindt zich een gasinlaat- en een gasuitlaatbuis ; de gasinlaatbuis gaat tot enkele mm van de bodem van de onderaan aangebrachte buis. Als reaktievat doet een erlenmeyer van 250 ml dienst (*). Onderaan is een korte buis van 5 cm lengte en 2 cm diameter gelast en op de zijkant is een gasuitlaatbuis met veiligheidsbulb aangebracht. De gasinlaat geschiedt bovenaan langs een buis die onderaan voorzien is van een grof gesinterde glasschijf.

Tussen de twee vaten wordt een kleine luchtpomp geplaatst. Alle verbindingen geschieden met silikoonrubber slangen van 10 mm inwendige diameter. Als koppelingen worden kogelslijpstukken 18/7 gebruikt. De luchtpomp dient olievrij te werken, omdat vluchtige componenten van de olie de bepaling kunnen beïnvloeden. Farber (3) gebruikt voor ieder apparaat een individuele pomp zonder smering met een diafragma uit

(*) Farber stelt een erlenmeyer van 125 ml voor ; het model van 250 ml bleek echter handiger te zijn in het gebruik.

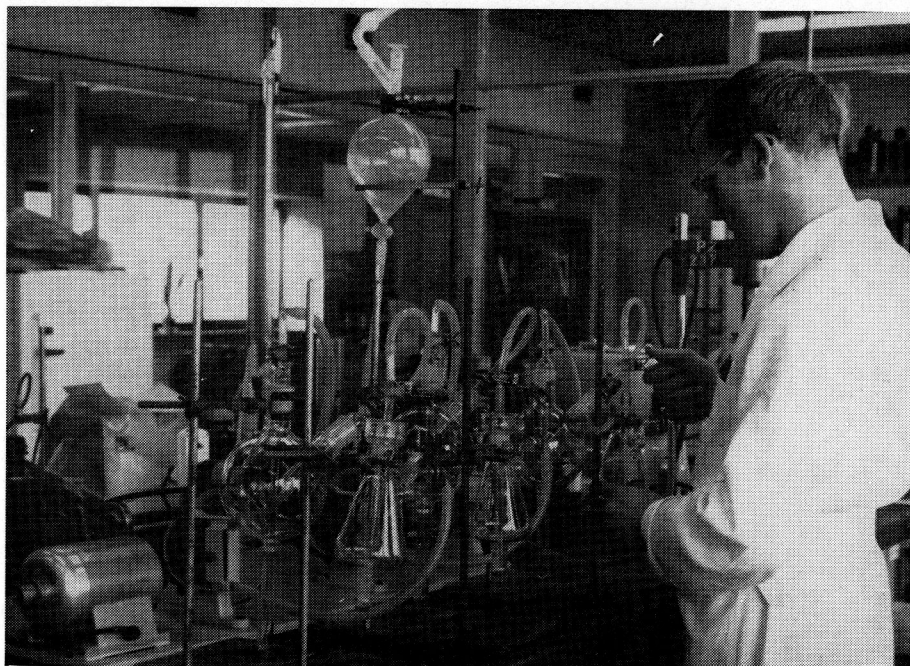


Fig. 1. — Inrichting voor het bepalen van de VRS.

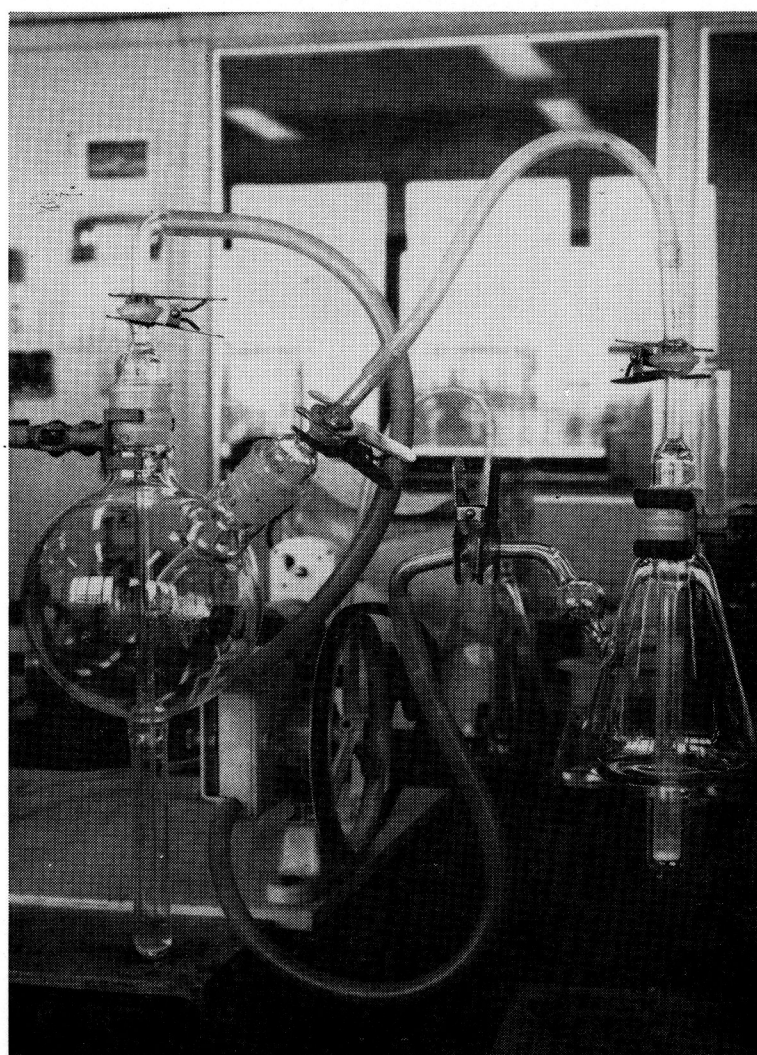


Fig. 2. — VRS-apparaat (gewoon model)
links : aëratiekolf; rechts . reaktiekolf

synthetische rubber. Dezelfde auteur, alsook Wittfogel (28) wijzen erop dat ook eenvoudige aquariumpompen kunnen worden aangewend.

Tijdens uitvoerige proefnemingen met dezelfde aquariumpompen als door Wittfogel gebruikt (Ozonla, Berlijn), bleek echter dat de resultaten weinig reproduceerbaar waren. De reden hiervoor dient te worden gezocht in het feit dat deze pompen een weinig konstant debiet hebben, zelfs als zij telkens met een ingeschakelde aërometer geijkt worden. Zij werden dan ook niet verder gebruikt (*).

Na talrijke voorproeven bleken aan eenzelfde as gekoppelde slangenpompen (WAB-pomp, Basel, Zwitserland) de beste resultaten op te leveren. Met deze opstelling immers is het debiet van iedere pomp praktisch identisch ; tevens kan de luchtstroom niet beoedeld worden, daar zij met geen enkel deel van de pomp in aanraking komt. De snelheid van de pompen werd geregeld op 300 toeren per min, hetgeen overeenkomt met een debiet van 180 l per uur. In de gebruikte opstelling werden drie VRS-apparaten naast elkaar gemonteerd. De drie pompen werden aangedreven door een motor van 1/10 pk met regelbare snelheid (figuur 1).

3.2. Reagentia.

- Kaliumpermanganaat 0,02 N in 1 N natriumhydroxyde
- Zwavelzuur 6 N
- Kaliumjodide 20 % in 0,1 % natriumcarbonaat,
- Natriumthiosulfaat : stockoplossing : 0,1 N in 0,2 % natriumcarbonaat en 0,1 % natriumboraat. Deze oplossing blijft maanden goed ; werkoplossing : 0,025 N : de stockoplossing 4 x verdunnen met dezelfde carbonaat-boraatoplossing.

(*) Dit betekent evenwel niet dat alle aquariumpompen a priori uit te sluiten zijn ; zij moeten echter in elk geval een konstant debiet hebben.

- Silikoon antischuimmiddel : UCB 1804.

3.3. Werkwijze.

Vijf ml vissap of visextrakt en 2 druppels silikoon antischuimmiddel worden in de aëratiekolf en 10 ml alkalische permanganaatoplossing in de reaktiekolf gebracht. De pomp wordt aangesloten en de diffusie juist 40 min doorgevoerd. Het niet gereduceerde permanganaat wordt met natriumthiosulfaat getitreerd. Hiervoor wordt het eerst aangezuurd met 5 ml 6 N zwavelzuur en worden 3 ml kaliumjodide-oplossing toegevoegd.

Telkens wordt een blanco uitgevoerd. De hoeveelheid vluchtige reducerende stoffen wordt uitgedrukt in mikro-equivalenten reductie per 5 ml vissap of visextrakt. De berekening geschiedt als volgt :

$$(V_B - V_M) \times 1.000 \times 0,025 = (V_B - V_M) 25 = \text{aantal mikro-equivalenten } (\mu\text{eq}) \text{ reductie}$$

waarbij V_B = aantal ml 0,025 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ voor titratie van blanco

V_M = aantal ml 0,025 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ voor titratie van monster

Voor de proef mogen enkel zorgvuldig gereinigde en stofvrije kolven gebruikt worden. De minste spoor organische stof kan immers met het permanganaat reageren en de resultaten foutief maken. Verder dient de toegevoegde hoeveelheid permanganaat zeer nauwkeurig afgepipeteerd te worden en de titratie met zorg uitgevoerd te worden. Een fout van 0,1 ml komt immers overeen met $2\mu\text{eq}$ reductie.

Ook onreinheiten in de lucht aanwezig in het toestel kunnen storend inwerken. Deze kunnen echter gemakkelijk verwijderd worden door de lucht in het apparaat vóór de proef enkele minuten door een afzonderlijk reaktievat gevuld met alkalische permanganaatoplossing te pompen.

3.4. Statistische analyse.

Tijdens de experimentele studie van de methode werden de proefnemingen telkens paarsgewijze op verschillende tijdstippen doorgevoerd. De significantie van een eventueel verschil werd getoetst met behulp van de methode van de gepaarde vergelijkingen volgens :

$$L = \frac{\bar{d}}{R_d}$$

waarin L = t-waarde berekend met behulp van de spreidingsbreedte, \bar{d} = gemiddeld verschil tussen de paarsgewijze uitgevoerde proeven en R_d de spreidingsbreedte van de verschillen.

Voor tien experimenten moet de bekomen L-waarde een kritische L-waarde van 0,34 (risiko 0,01) of 0,23 (risiko 0,05) overtreffen om significant te zijn (1).

Indien het gemiddeld verschil significant bevonden werd, werd het betrouwbaarheidsinterval ervan bepaald volgens :

$$\bar{d} \pm R_d \cdot 0,34 \text{ (risiko 0,01) of } \bar{d} \pm R_d \cdot 0,23 \text{ (risiko 0,05)}$$

4. Experimentele studie van de methode.

4.1. Invloed van de bereiding van de vismonsters op de VRS-bepaling.

Voor de VRS-bepaling wordt meestal vissap gebruikt. Ook een gefiltreerd extrakt van met water gemixte vis kan worden aangewend.

De bereiding van het vissap kan gebeuren met behulp van een hydraulische pers, handpersen (type fruitpersen) en elektrische centrifugen (type groenten- en fruitsapcentrifugen).

Meestal wordt de hydraulische pers gebruikt. Een hoeveelheid vis (gewoonlijk 100 g) wordt in verschillende lagen niet absorberende gaas gewikkeld en in een cylinder geplaatst. Aan de onderkant van de cylinder zijn openingen aangebracht om het sap te laten uitlopen. Een nauwpassende zuiger wordt in de cylinder geschoven en de pers in werking gesteld.

Tijdens talrijke voorproeven werd echter vastgesteld dat deze methode nogal omslachtig is en voor vette (bv. haring - *Clupea harengus* L) en halfvette vissen (bv. rode zeebaars - *Sebastes marinus* L) zeer dikwijls een onvoldoende hoeveelheid sap geeft. Het gebruik van een elektrische centrifuge, zoals door Wittfogel (28) voorgesteld, bleek goede resultaten te geven met magere vissen (bv. kabeljauw - *Gadus morrhua* L), maar was niet te gebruiken voor vette en halfvette vissen.

Om deze reden werd gepoogd een meer eenvoudig en voor alle vissen passende techniek te vinden.

Na talrijke oriënterende proeven bleek een kleine handpers met licht konische schijven (figuur 3) uitstekend te beantwoorden aan de gestelde eisen (Presse médicale, AS, Parijs). Ten einde de mogelijke invloeden van verschillen in druk, persduur enz. te kunnen nagaan, werd een uitgebreide reeks proefnemingen gewijd aan de studie van de vissapbereiding met dit apparaat. Verschillende kwantitatieve aspecten werden hierbij nagegaan. De resultaten hiervan zullen afzonderlijk worden gepubliceerd.

De gegevens van belang voor de VRS-methode worden hier echter meer in detail behandeld.

4.1.1. Invloed van de persdruk.

Tussen 5 schijven wordt 100 g vis, verdeeld in stukken van ca 10 g, aangebracht. De veer wordt aangespannen en kan op een bepaalde druk worden ingesteld. Om na te gaan of een verschil in druk een invloed heeft op de hoeveelheid vluchtige reducerende stoffen van het sap werd een reeks proeven uitgevoerd, waarbij drukken van respectievelijk 0,35 en 0,50 kg cm² toegepast werd. Deze drukken werden gekozen omdat bij ca 0,35 kg/cm² de eerste druppels vissap vrijkomen en bij drukken van meer dan 0,50 kg/cm² stukken visvlees uit de schijven kunnen geduwd worden. De twee drukken kunnen het gemakkelijkst ingesteld worden met behulp van een momentsleutel (figuur 3); voor de gebruikte pers kwam dit overeen met momenten van respectievelijk 0,10 en 0,15 kgm. Door het verlies van sap vermindert de druk geleidelijk; na respectievelijk 10 en 20 min, werd de veer dan ook terug aangespannen. Na 30 min werd het persen beëindigd daar het bleek dat niet veel bijkomend sap meer vrijkwam.

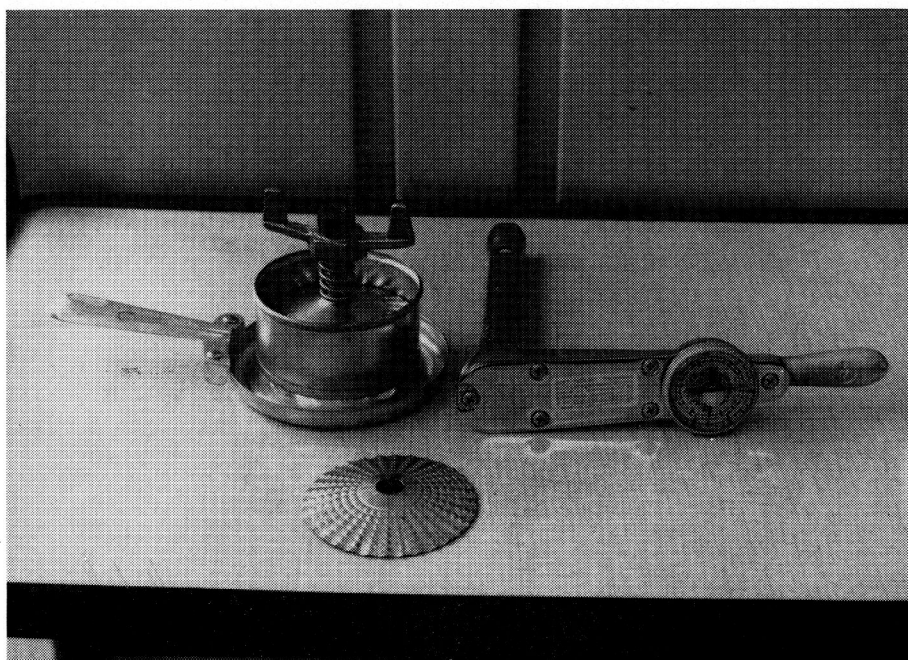


Fig. 3. — Handpers voor de bereiding van vissap (rechts : momentsleutel)

De proef werd tienmaal herhaald op kabeljauw van verschillende versheid en op afzonderlijke tijdstippen (tabel 1).

Tabel 1 - Invloed van de persdruk op de VRS-waarden in (μeq).

Proef	Lage druk (0,35 kg/cm ²)	Hoge druk (0,50 kg/cm ²)	Verskil
1	8,7	12,5	+ 3,8
2	30,0	33,7	+ 3,7
3	27,5	35,0	+ 7,5
4	7,5	10,0	+ 2,5
5	15,0	15,0	0
6	16,2	20,0	+ 3,8
7	7,5	11,2	+ 3,7
8	30,0	32,5	+ 2,5
9	5,0	5,0	0
10	15,0	20,0	+ 5,0
Gemiddeld Verskil			+ 3,25

Uit tabel 1 volgt, dat een hogere druk hogere VRS-waarden geeft. Het verschil bedroeg gemiddeld + 3,25 μeq of 20,0 %.

Met een spreidingsbreedte van 7,5 μeq bedraagt $L = 0,426$, hetgeen de kritische waarde van 0,34 overtreft ; het gevonden verschil is dus zeer significant. Het betrouwbaarheidsinterval van het gemiddeld verschil is trouwens met een risico van 0,01 begrepen tussen + 0,70 en + 5,80 μeq . Men kan dan ook besluiten dat de persdruk wel degelijk een invloed op de VRS-bepaling heeft.

Daar anderzijds de hoeveelheden sap bij de hogere druk beduidend belangrijker zijn werd besloten voor de verdere proeven steeds de hoge druk te gebruiken voor het persen.

4.1.2. Invloed van de duur van het persen.

Tijdens analoge proefnemingen werd de invloed van de duur van persen m.a.w. de homogeniteit van het gehalte aan vluchtige reducerende stoffen van het vrijkomende sap van kabeljauw nagegaan (tabel 2).

Tabel 2 - Invloed van de duur van het persen op de VRS-bepaling (in μ eq).

Proef	Na 10 min	Tussen 10 en 20 min	Tussen 20 en 30 min
1	10,0	12,5	12,5
2	12,5	15,0	15,0
3	5,0	2,5	2,5
4	30,0	22,5	--
5	5,0	5,0	2,5
6	33,7	33,7	33,7
7	11,2	11,2	8,7
8	20,0	22,5	20,0
9	35,0	32,5	32,5
10	10,0	12,5	12,5

Uit deze resultaten blijkt, dat het gehalte aan vluchtige reducerende stoffen tamelijk konstant is. Er werd trouwens geen significant verschil gevonden tussen de drie groepen waarnemingen.

Dit betekent dat de duur van persen - in tegenstelling met de persdruk - weinig belang heeft voor de VRS-bepaling en dan ook niet streng dient te worden in acht genomen. Er valt op te merken dat na 10 min ongeveer 60 % van de totale hoeveelheid sap vrijgekomen is en dat tussen 10 en 20 min en tussen 20 en 30 min telkens ongeveer 20 % vrijkomt. Om redenen van praktische aard, nl. om steeds een voldoende hoeveelheid vissap te bekomen, is het aan te raden het persen ongeveer 30 min door te voeren.

4.1.3. Vergelijkende studie perssap, centrifugesap en waterig extrakt.

Zoals hoger werd vermeld, kan behalve door persen het vissap ook verkregen worden door centrifugeren. Daar ook een waterig extrakt eventueel in aanmerking kan komen, werd een reeks vergelijkende proeven uitgevoerd op kabeljauw ten einde na te gaan of een verschil in gehalte aan vluchtige reducerende stoffen tussen de drie methoden vastgesteld kan worden. Het centrifugesap werd verkregen door 100 g vis, verdeeld in stukken van 10 à 20 g, in een huishoudelijke fruitsapcentrifuge (Braun) te brengen. Na het laatste stuk laat men de centrifuge 5 min doordraaien.

Het waterig extrakt werd bereid door 50 g vis gedurende 2 min in 200 ml water te mixen en te filtreren ; 5 ml werden genomen voor de VRS-bepaling.

Tien vergelijkende proeven werden uitgevoerd op verschillende tijdstippen. De resultaten zijn weergegeven in tabel 3.

Tabel 3 - Vergelijkende proeven perssap-centrifugesap-waterig
extrakt (in μeq).

Proef	Perssap	Centrifuge- sap	Vershil t.o.v. perssap	Waterig extrakt	Vershil t.o.v. perssap
1	27,5	17,5	-10,0	12,5	-15,0
2	35,0	25,0	-10,0	8,7	-26,3
3	35,0	18,7	-16,3	10,0	-25,0
4	30,0	20,0	-10,0	13,7	-16,3
5	30,0	30,0	0	12,5	-17,5
6	8,7	11,2	+ 2,5	0	- 8,7
7	10,0	11,2	+ 1,2	7,5	- 2,5
8	12,5	7,5	- 5,0	5,0	- 7,5
9	8,7	7,5	- 1,2	5,0	- 3,7
10	13,7	10,0	- 3,7	5,0	- 8,7
Gemiddeld verschil			- 5,25		-13,12

Uit deze resultaten komt naar voren, dat het centrifugesap gemiddeld 5,25 μeq of 24,6 % en het waterig extrakt 13,1 μeq of 37,9 % lager liggen dan het perssap.

Voor het centrifugesap is $L = 0,279$, hetgeen significant is met een risico van 0,05 (grenswaarde 0,23), maar niet meer met een risico van 0,01. Het 95 % betrouwbaarheidsinterval van het gemiddelde bedraagt -0,93 tot -9,57 μeq , hetzij volledig in het negatief gebied. Met een risico van 0,01 echter bekommt men + 1,14 tot -11,64 μeq .

Voor het waterig extrakt is $L = 0,51$, hetgeen zeer significant is ; het 99 % betrouwbaarheidsinterval van het gemiddelde bedraagt : -5,1 tot -21,1 μeq , m.a.w. volledig in het negatief gebied.

Men kan dan ook besluiten dat zowel het centrifugesap als het waterig extrakt significant lagere waarden geven dan het perssap. Uit tabel 3 kan men daarbij ook opmaken dat dit verschil onderhevig is aan grote variaties. De oorzaak hiervan werd niet verder onderzocht. Daar het gebruik van centrifugesap of waterig extrakt geen bijzonder praktische voordelen oplevert voor verse vis werd voor de verdere proeven steeds de voorkeur gegeven aan het perssap.

4.1.4. Invloed van het filtreren en centrifugeren van het vissap.

Door Farber (3) wordt aangeraden het vissap vóór de proef te filtreren en te centrifugeren. Ten einde de invloed hiervan na te gaan, werden tien vergelijkende proeven op kabeljauw uitgevoerd. Het sap werd gefiltreerd door een plooifilter en gedurende 5 min bij 4.000 t/min gecentrifugeerd. Uit de resultaten (tabel 4) blijkt dat de VRS-waarden van gecentrifugeerd sap gemiddeld 0,46 meq of 3,7 % hoger lagen. Dit verschil bleek echter niet significant te zijn ($L = 0,055$). Men kan dan ook besluiten dat het centrifugeren van het sap geen bijzondere voordelen biedt.

Tabel 4 - Invloed van het centrifugeren van het vissap op de VRS-bepaling (in μeq).

Proef	Niet gecentrifugeerd	Gecentrifugeerd	Verskil
1	6,2	3,8	- 2,4
2	3,0	3,8	+ 0,8
3	5,0	3,0	- 2,0
4	12,5	17,5	+ 5,0
5	3,0	2,5	- 0,5
6	2,5	2,5	0
7	5,0	7,5	+ 2,5
8	12,0	8,7	- 3,3
9	35,0	38,7	+ 3,7
10	40,0	40,8	+ 0,8
Gemiddeld verschil			+ 0,46

4.1.5. Invloed van de hoeveelheid geperste vis.

Zoals werd opgegeven, wordt in de pers gewoonlijk 100 g vis gebracht. Ten einde echter na te gaan of deze hoeveelheid streng in acht dient te worden genomen, werd een reeks controleproeven uitgevoerd met respectievelijk 100 en 110 g rode zeebaars. De resultaten zijn weergegeven in tabel 5 en tonen aan dat de VRS-waarden van het sap afkomstig van 110 g vis gemiddeld $0,99 \mu\text{eq}$ of 2,7 % hoger lagen. Dit verschil was echter niet significant ($L = 0,082$). Aanvullende proeven met kabeljauw en haring gaven analoge resultaten.

Tabel 5 - Invloed van de hoeveelheid geperste vis op de VRS-bepaling (in μeq).

Proef	100 g vis	110 g vis	Verskil
1	22,0	25,7	+ 3,7
2	23,2	22,3	- 0,9
3	32,0	40,0	+ 8,0
4	47,5	48,8	+ 1,3
5	37,5	35,0	- 2,5
6	45,0	40,8	- 4,2
7	41,3	43,2	+ 0,9
8	42,5	43,3	+ 0,8
9	47,0	50,0	+ 3,0
10	12,5	12,5	0
Gemiddeld verschil			+ 0,99

Het belangrijk besluit van deze proeven is dat de hoeveelheid vis niet nauwkeurig moet worden afgewogen. De resultaten liggen trouwens in de lijn van de proefnemingen over persdruk en -duur : zolang de persdruk dezelfde is geeft het vissap praktisch gelijke VRS-waarden.

4.2. Invloed van het pompdebiet.

Zoals reeds werd vermeld, is de hoeveelheid reducerende stoffen die in de oxyderende oplossing overgebracht worden afhankelijk van het volume lucht dat door het vissap gepompt wordt. Het pompdebiet moet dus konstant zijn. Om na te gaan of dit in praktijkomstandigheden een significante invloed heeft, werd een reeks van tien vergelijkende proeven op kabeljauw uitgevoerd ; hierbij werden enerzijds het normaal

aangewend debiet van 180 l/uur (300 t/min) en anderzijds een debiet van 120 l/uur (200 t/min) getest. De resultaten zijn vermeld in tabel 6.

Tabel 6 - Invloed van het pompdebiet op de VRS-bepaling (in μeq).

Proef	180 l/uur	120 l/uur	Vershil
1	8,7	7,5	-1,2
2	30,0	30,0	0
3	27,5	28,7	+1,2
4	7,5	5,0	-2,5
5	15,0	10,0	-5,0
6	16,2	15,0	-1,2
7	12,5	11,2	-1,3
8	33,7	32,5	-1,2
9	35,0	30,0	-5,0
10	10,0	5,0	-5,0
Gemiddeld verschil :			-2,12

Het gemiddeld verschil van $-2,12 \mu\text{eq}$ of $10,8 \%$ is significant ($L = 0,342$), terwijl het 99% betrouwbaarheidsinterval begrepen is tussen $-0,01$ en $-4,23 \mu\text{eq}$, hetzij volledig in het negatief gebied. Er moet dus wel degelijk rekening worden gehouden met het pompdebiet wil men vergelijkbare resultaten bekomen.

Met een debiet van 120 l/uur bekomt men VRS-waarden die gemiddeld $10,8 \%$ lager liggen dan met 180 l/uur. Hieruit kan echter ook besloten worden dat een klein verschil in draaisnelheid zonder grote bezwaren kan worden toegelaten.

Voor een verschil in aantal toeren van bv. 10 % (tussen 270 en 330 t/min) zal het gemiddeld verschil in VRS-waarden minder dan 3 % bedragen, hetgeen te verwaarlozen is.

Kleine variaties in draaisnelheid veroorzaakt door een wijziging van de netspanning of door sleet op de aandrijvingsriemen zijn dan ook van weinig belang en het aantal toeren dient niet voor iedere proef te worden geregeld.

4.3. Het gebruik van vereenvoudigde apparatuur.

Voor routine-onderzoek (bv. in controlelaboratoria) is de beschreven apparatuur - en vooral de aëratiekolf-relatief ingewikkeld en zij valt daarenboven tamelijk duur uit.

Er werd dan ook beproefd de aëratiekolf te vervangen door een gewone buis van 15 cm lengte en 2,5 cm diameter, voorzien van in- en uitlaat (figuur 4). Een reeks van tien vergelijkende proeven werd daartoe op rode zeebaars uitgevoerd (tabel 7).

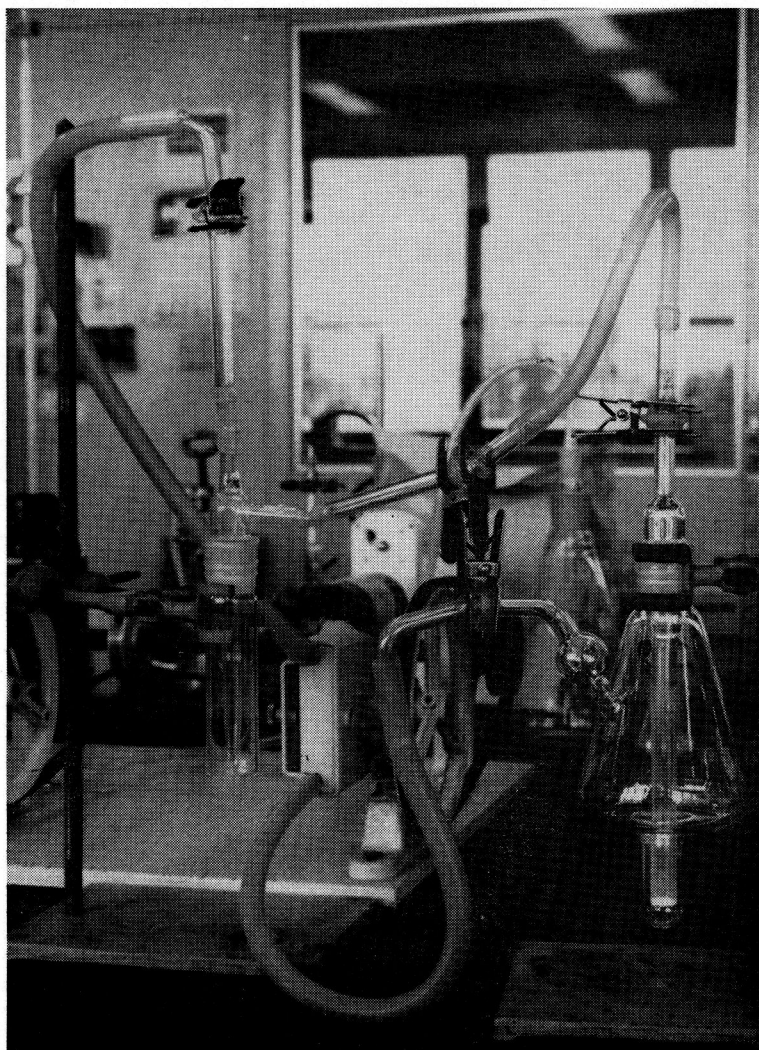


Fig. 4. — VRS-apparaat (vereenvoudigd model)

links : kleine aëratiebuis; rechts : reaktiekolf

Tabel 7 - Vergelijkende proeven met grote en kleine aëratiekolven (VRS in μeq).

Proef	Grote kolf	Kleine kolf	Vershil
1	22,0	20,0	-2,0
2	23,2	23,8	+0,6
3	32,2	32,5	+0,5
4	47,5	47,5	0
5	37,5	38,8	+1,3
6	45,0	43,8	-2,2
7	41,3	40,0	-1,3
8	42,5	42,0	-0,5
9	47,0	47,5	+0,5
10	12,5	12,0	-0,5
Gemiddeld Verschil			-0,36

Het gemiddeld verschil van $-0,36 \mu\text{eq}$ of 1,0 % bleek niet significant te zijn. Een kleine aëratiekolf kan dan ook zonder bezwaar worden aangewend. Er moet opgemerkt worden dat analoge resultaten bekomen werden wanneer kabeljauw en haring gebruikt werden.

4.4. Invloed van het inkuberen van het vissap.

Door Farber en Lerke (5) wordt vooropgesteld dat het inkuberen van het vissap vóór de VRS-bepaling een beter inzicht geeft in de te verwachten bewaarkapaciteit van de vis, wanneer men de bekomen VRS-waarde vergelijkt met deze van het niet geïnkubeerde sap.

Het bederf van de vis wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door bakteriële aktie. De mogelijkheid bestaat aldus dat door het inkuberen de ontwikkeling van de aanwezige mikro-organismen dermate versneld wordt, dat men onmiddellijk een beeld bekomt van de versheidsstaat van de onderzochte vis verschillende dagen later.

Ook voor andere objektieve kwaliteitsmethoden werd dit sporadisch onderzocht. Zo kwam Hess (9) tot de konklusie dat het inkuberen van de vis gedurende drie uur bij 25°C vóór de TMA-bepaling een beter inzicht in de kwaliteit gaf. Vaisey (21) kwam tot hetzelfde besluit met de bepaling van de vrije tyrosine, terwijl Tarr (20) rapporteert dat direkte bakterietellingen nuttige indikaties kunnen geven nopens de versheidstoestand en de bewaarkapaciteit van de vis na 24 uur inkuberen bij 15°C.

Om dit voor de VRS-methode na te gaan, werden drie reeksen van tien vergelijkende proeven uitgevoerd met kabeljauw, rode zeebaars en haring (vette volle haring). Het vissap werd hiervoor 5 uur geïnkubeerd bij 30°C. De resultaten zijn in tabel 8 vermeld.

Tabel 8 - Invloed van het inkuberen (5 u bij 30°C) op de VRS-waarden van kabeljauw, rode zeebaars en haring (in μeq).

Vissoort	Proef	Zonder Inkubatie	Na Inkubatie	Vershil
Kabeljauw	1	17,5	17,5	0
	2	25,0	25,0	0
	3	18,7	18,7	0
	4	20,0	16,2	-3,8
	5	30,0	28,7	-1,3
	6	11,2	11,2	0
	7	11,2	13,7	+2,5
	8	12,5	15,0	+2,5
	9	7,5	5,0	-2,5
	10	10,0	6,2	-3,8
Gemiddel verschil				-0,64
Rode zeebaars	1	22,0	27,5	+5,5
	2	23,2	24,5	+1,3
	3	32,0	38,3	+6,3
	4	47,5	50,0	+2,5
	5	37,5	38,8	+1,3
	6	45,0	45,0	0
	7	41,3	41,3	0
	8	42,5	45,0	+2,5
	9	47,0	50,0	+3,0
	10	12,5	13,5	+1,0
Gemiddeld verschil				+2,34
Haring	1	22,5	48,2	+25,7
	2	51,2	67,5	+16,3
	3	23,2	43,2	+20,0
	4	30,8	54,5	+23,7
	5	52,0	68,7	+16,7
	6	62,5	67,5	+ 5,0
	7	65,8	63,8	- 2,0
	8	35,0	47,5	+12,5
	9	56,2	57,0	+ 0,8
	10	10,0	15,0	+ 5,0
Gemiddeld verschil				+12,37

Voor kabeljauw werd na inkubatie een gemiddeld verschil van $-0,64 \mu\text{eq}$ of $-3,9 \%$ waargenomen ; dit verschil bleek echter niet significant te zijn ($L = 0,101$).

Voor rode zeebaars en haring werd een positief verschil van respectievelijk $2,34 \mu\text{eq}$ (of $6,7 \%$) en $12,37 \mu\text{eq}$ (of $30,2 \%$) bekomen. De respektievelijke L-waarden bedroegen $0,371$ en $0,446$, hetgeen zeer significant is.

Voor rode zeebaars lag het 99% betrouwbaarheids-interval van het gemiddeld verschil tussen $+0,20$ en $+4,48 \mu\text{eq}$, voor haring tussen $+2,96$ en $+21,78 \mu\text{eq}$, of beiden volledig in het positief gebied.

Het praktisch besluit van deze proeven is het feit dat het voor magere vis (kabeljauw) geen nut blijkt te hebben het sap vooraf te inkuberen. Voor half-vette (rode zeebaars) en vette soorten (haring) blijkt het inkuberen wel een significant verschil in VRS-waarde te geven. In hoeverre dit voor de objektieve kwaliteitsbepaling van belang is, zal tijdens verdere proefnemingen dienen te worden onderzocht.

4.5. Reproduceerbaarheid van de methode.

De reproduceerbaarheid van de VRS-methode werd nagegaan aan de hand van de dubbelproeven die op verschillende tijdstippen voor de diverse experimenten werden uitgevoerd. Alle analyses werden met de normale techniek (5 ml vissap, 40 min aëratie, 300 t/min) op kabeljauw, rode zeebaars, doornhaai (*Squalus acanthias* L) en haring uitgevoerd.

De standaardafwijking werd bepaald volgens

$$s = \sqrt{\frac{d^2}{2n}}$$

waarbij d = verschil tussen dubbelproeven en n = aantal dubbelproeven. De nodige gegevens zijn in tabel 9 opgenomen.

Tabel 9 - Reproduceerbaarheid van de VRS-methode.

Vissoort	Aantal dubbelproeven	Gemiddeld verschil (in μeq)	Maximum verschil (in μeq)	Standaardafwijking (in μeq)
Kabeljauw	125	0,52	2,5	0,45
Rode zeebaars	60	0,75	2,5	0,65
Doornhaai	105	1,70	5,0	1,50
Haring	120	1,12	5,0	0,97

Uit deze gegevens volgt, dat de nauwkeurigheid van de methode voor de diverse vissoorten niet dezelfde is. Toepassing van de F-test toonde aan dat de standaardafwijkingen significant verschilden.

Voor half-vette en vette vissen ligt de reproduceerbaarheid lager. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de zachtere consistentie van deze vissoorten, waardoor het vissap meer troebel (kolloïdaal) is en de homogeniteit van het diffusieproces meer beïnvloedt dan het sap van magere vis. De duidelijk hogere standaardafwijking van doornhaai, waarvan het sap het meest troebel en viskeus is, zou hierop wijzen.

Algemeen gezien mag men echter besluiten dat de in deze publikatie beschreven methode een zeer bevredigende reproduceerbaarheid heeft.

5. Bewaarprouven.

Ten einde een inzicht te bekomen in het verloop van de VRS-waarden tijdens het bewaren van vis, werd een reeks bewaarprouven op kabeljauw, rode zeebaars, haring en doornhaai uitgevoerd.

5.1. Proefomstandigheden.

Volgende vissoorten werden gebruikt :

- Kabeljauw : ca 2,5 kg per stuk, afkomstig van de Noordzee
periode november-februari, ca 2 dagen oud.
- Rode zeebaars : ca 1 kg per stuk, afkomstig van IJsland,
periode november-februari, ca 5 dagen oud.
- Haring : ca 150 g per stuk, afkomstig van de Noordzee, periode
juli-augustus (volle haring), ca 2 dagen oud.
- Doornhaai : ca 1 kg per stuk, afkomstig van de Noordzee,
periode oktober-december, ca 2 dagen oud.

De doornhaai werden vóór het begin van de prouven ontkopt en gestroopt ; in de praktijk is dit de gebruikelijke manier van bewaren. Voor de prouven werden zoveel mogelijk vissen van dezelfde versheidsgraad genomen. Voor kabeljauw en rode zeebaars werden hierbij vissen genomen die respektievelijk tussen 55 à 65 en tussen 25 à 35 vistestereenheden lagen. Uit een vorig onderzoek (24) (25) is immers gebleken dat de vistester hiervoor een geschikt laboratoriumapparaat is.

Alle vissen hadden bij het begin van de proef een temperatuur van 0,5 à 1°C.

Om de 2 dagen werden de VRS-waarden volgens de gewone methode bepaald. De prouven werden een tiental malen, op verschillende tijdstippen, herhaald.

5.2. Resultaten en diskussie.

De bekomen bederfcurven zijn in figuur 5 weergegeven. De spreidingsbreedte van de resultaten werd telkens aangeduid.

Uit deze figuren kan worden afgeleid, dat de VRS-waarden op bevredigende wijze het bederf van de vis volgen. Men bemerkt echter dat de waarden tot een tiental dagen relatief stationnair blijven, om dan zeer vlug op te lopen. De VRS-methode is dus niet geschikt om de houdbaarheid van de vis op preciese wijze te voorspellen en benadert in dit opzicht de bruikbaarheid van andere objektieve kwaliteitsmethoden, zoals de bepaling van de totale vluchtige basische stikstof (TVB) en van het trimethylamine (TMA).

Uitgebreide vergelijkende proeven tussen de VRS-methode en een vijftal andere methoden wezen trouwens op een goede overeenkomst (26).

De waarde van de VRS-methode ligt echter wel in het feit dat ook kraakbeenvissen (bv. doornhaai) in aanmerking kunnen komen. Door de hoge concentratie (1,5 à 2 %) aan ureum in deze vissen zijn inderdaad weinig methoden geschikt. Door het destilleren immers wordt het ureum gesplitst in ammoniak en koolstofdioxyde. Deze verbindingen storen bv. de bepaling van de TVB-, de TMA- en de vluchtige zuren.

Het werkelijke nut van de VRS-bepaling zal echter tijdens volgende experimenten verder getest moeten worden. Er zal namelijk dienen te worden nagegaan of de methode in alle omstandigheden op dezelfde wijze reageert en of zij ook op andere vissoorten van toepassing is.

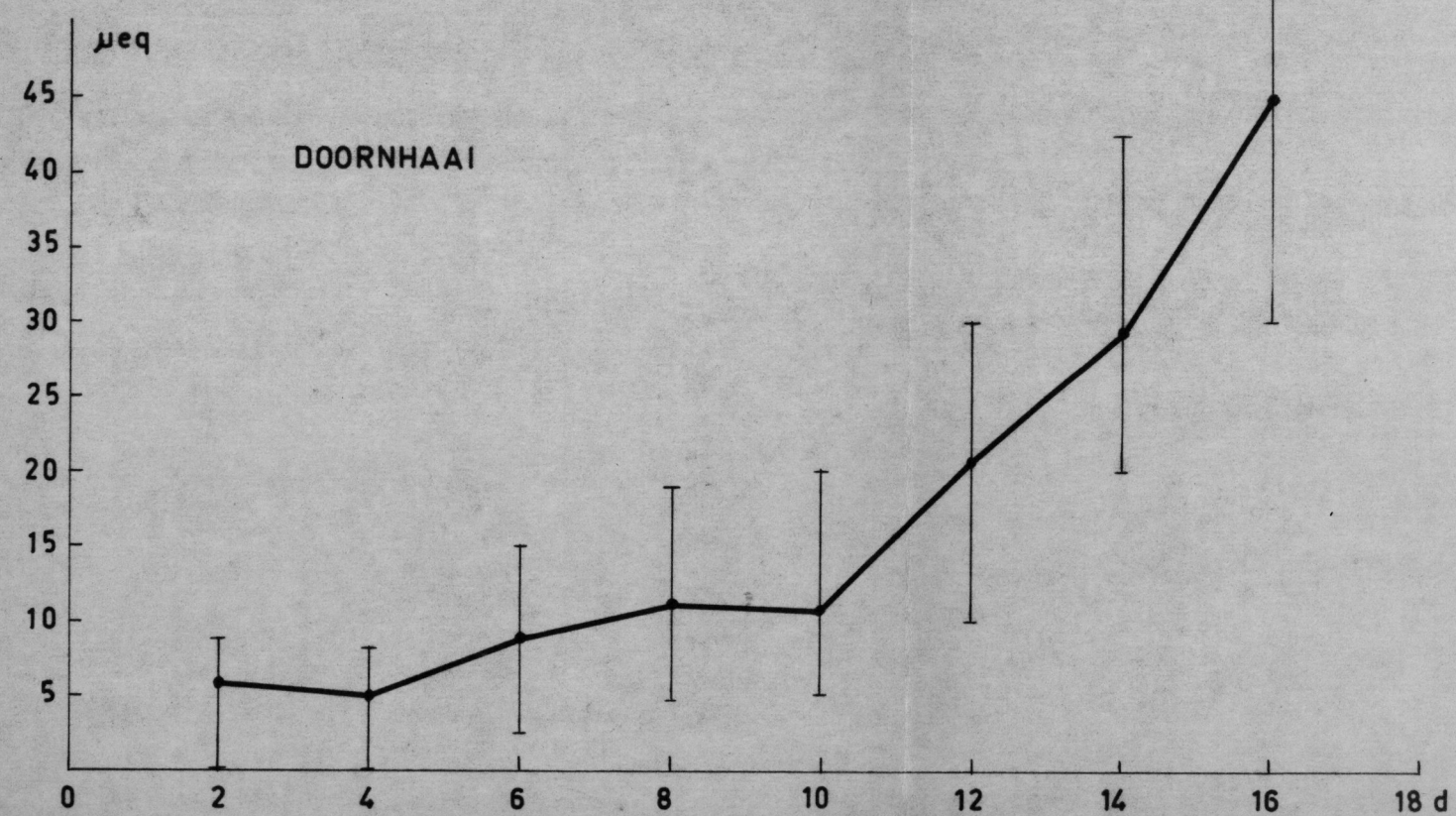
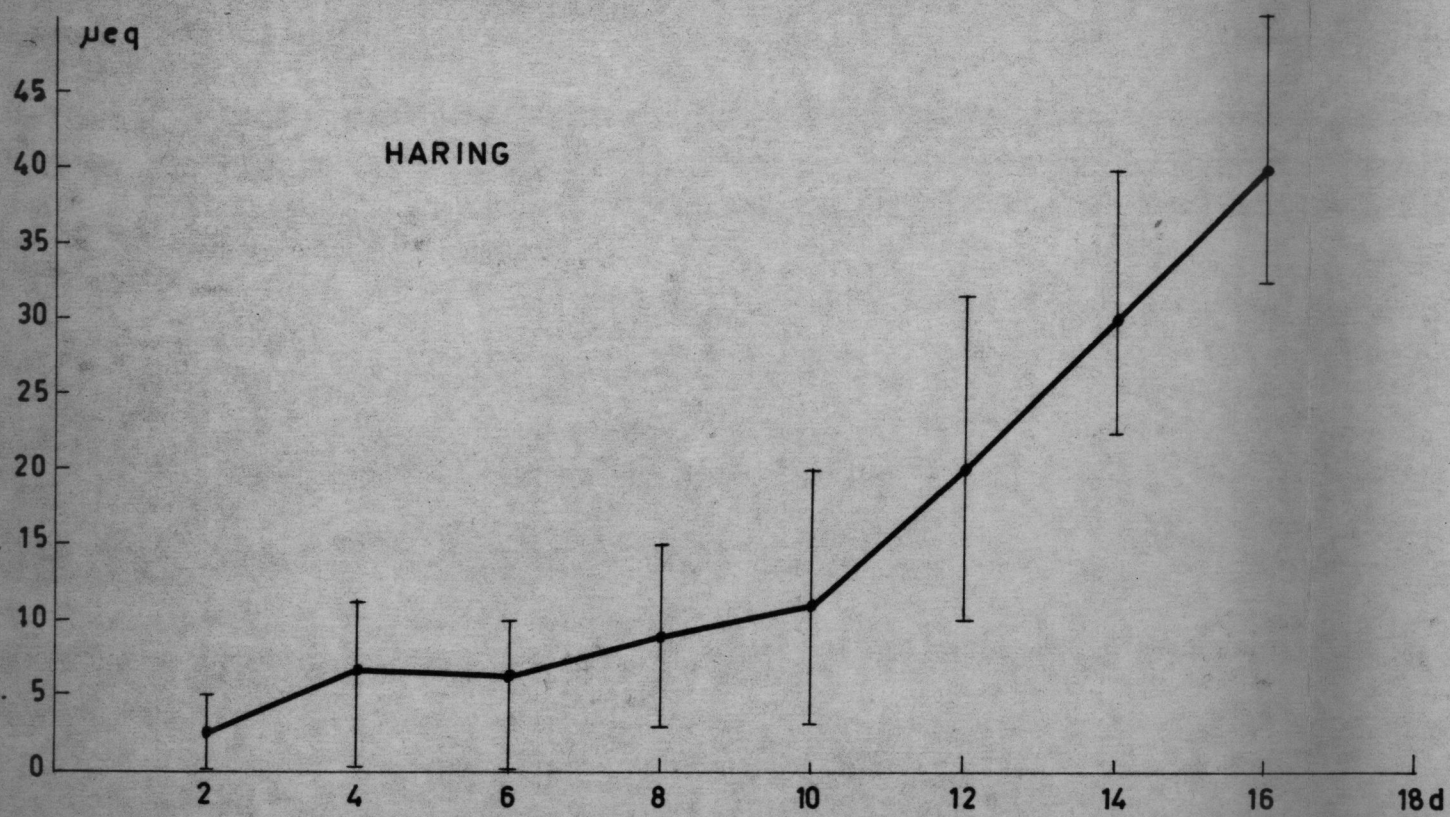
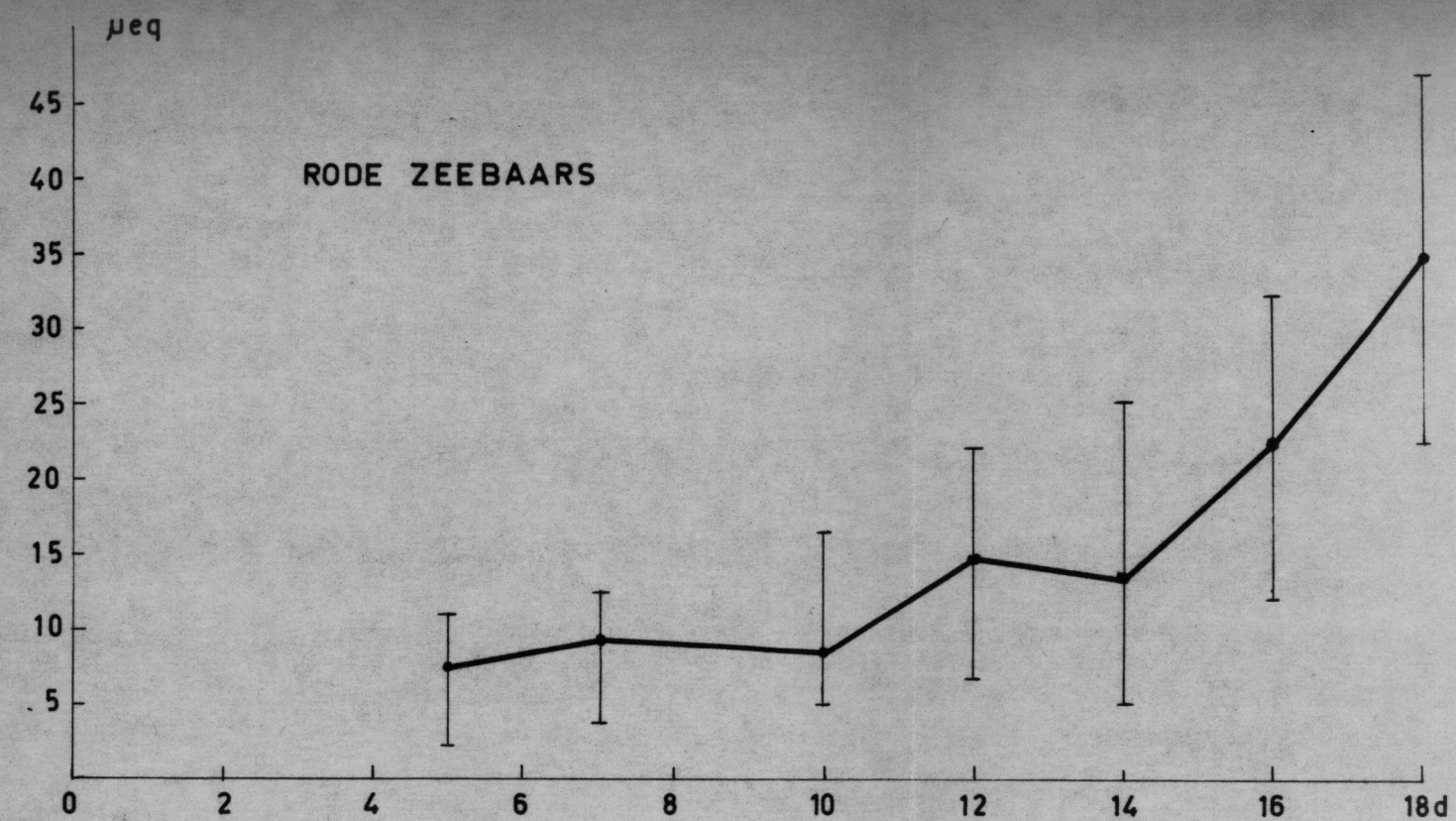
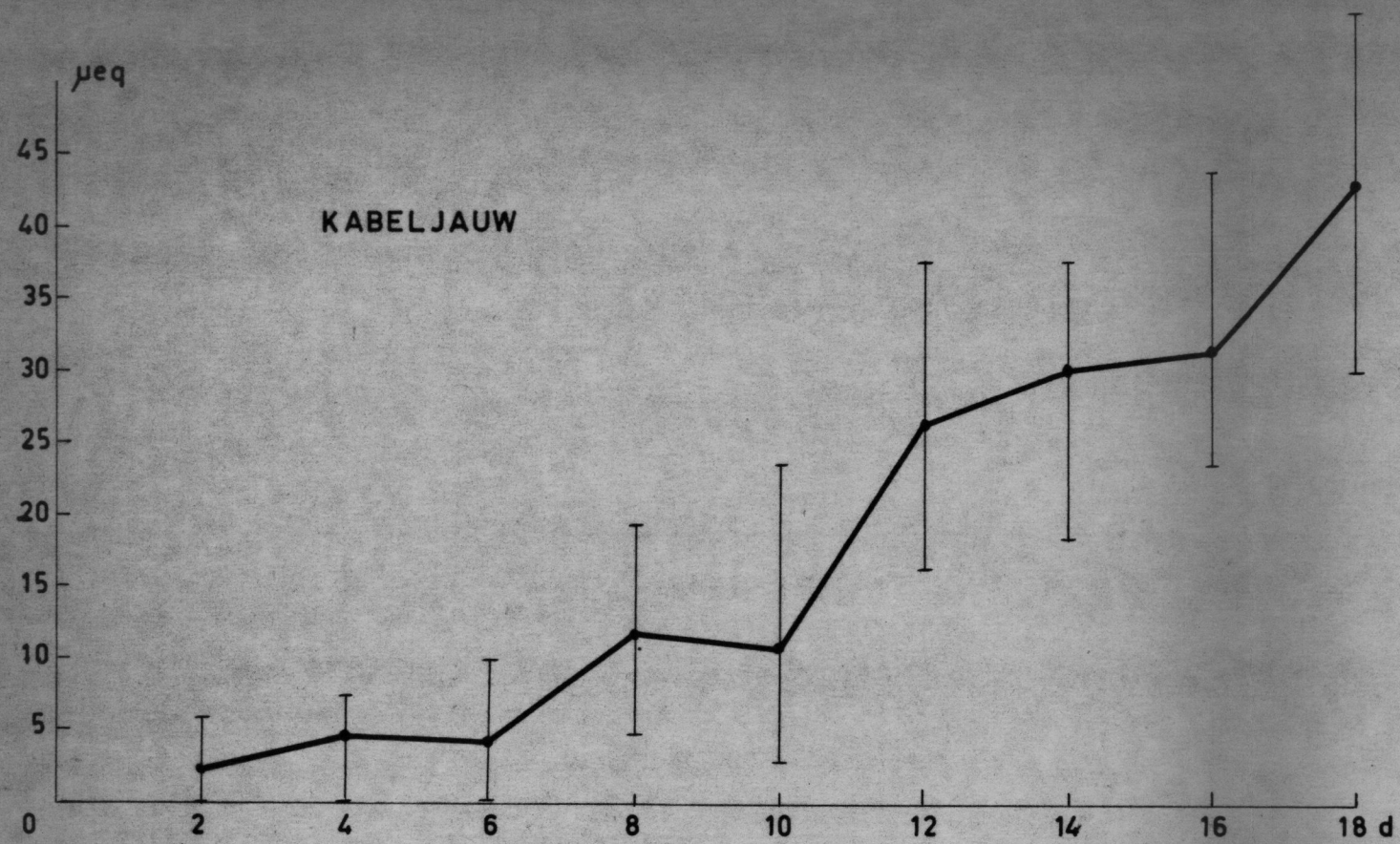


Fig. 5 - Verloop van de VRS-waarden bij kabeljauw, rode zeebaars, haring, en doornhaai.

5.3. Grens van bederf.

Uit de tot nog toe uitgevoerde proeven kunnen mits het nodige voorbehoud volgende grenzen voor bederf opgegeven worden : kabeljauw en doornhaai : 25-30 μ eq, rode zeebaars en haring : 20-25 μ eq.

Of deze grenzen in alle omstandigheden van toepassing zijn zal nog verder moeten worden onderzocht. Dat de gebruikte technieken hierbij van groot belang zijn, blijkt wel uit het feit dat Farber (7) als grens van bederf 15 μ eq, Wittfogel (28) 30 μ eq en Moorjani e.a. (13) 20 μ eq opgeven. De gebruikte methoden waren echter niet volledig identisch.

6. Andere toepassingsdomeinen van de VRS-methode.

Alhoewel dit tijdens deze studie niet werd onderzocht, kan toch worden vermeld dat de resultaten die in het buitenland werden bekomen er zouden op wijzen dat de VRS-methode een geschikte methode is ook voor het bepalen van de kwaliteit van verwerkte vis en visserijprodukten zoals bv. gemarineerde, gezouten en ingeblikte vis, vispasteien, vissausen, schaal- en weekdieren enz. Ook op dit gebied zou de methode meer voordelen bieden dan andere bepalingen, zoals bv. TVB of TMA (8).

Samenvatting.

Het principe van de bepaling van de vluchtige reducerende stoffen (VRS) in vis is als volgt. Een luchtstroom wordt door een monster vissap of visextrakt gepompt waardoor de vluchtige bederfkomponenten die overwegend reducerende bindingen zijn, meegevoerd worden. De luchtstroom wordt dan door een kaliumpermanganaatoplossing geleid waarvan een deel door de VRS gereduceerd wordt. De graad van de reductie vormt aldus een maatstaf voor de versheidsgraad van de vis.

De proefomstandigheden van de methode werden aan een uitgebreid onderzoek onderworpen. Meer in het bijzonder werden nagegaan : de invloed van de bereiding van de vismonsters, van het pompdebiet, van het gebruik van vereenvoudigde apparatuur en van het inkuberen van het vissap. Ook de reproduceerbaarheid van de methode werd bepaald voor kabeljauw, (*Gadus morrhua* L), rode zeebaars (*Sebastes marinus* L), doornhaai (*Squalus acanthias* L) en haring (*Clupe harengus* L).

Vervolgens werden met deze vissoorten enkele reeksen bewaarproeven uitgevoerd ten einde een inzicht in de waarde van de VRS-bepaling als objektieve kwaliteitsmethode te bekomen. Hieruit kon besloten worden dat de VRS-waarden op bevredigende wijze het bederf van de vis volgen alhoewel zij niet zeer geschikt blijken te zijn om de houdbaarheid van de vis op preciese wijze te voorspellen.

De VRS-methode is echter vooral van belang voor de kwaliteitsbepaling van kraakbeenvissen (bv. doornhaai) waarvoor tot nog toe zeer weinig methoden blijken geschikt te zijn.

LITERATUUR

- (1) E. BAUER - A statistical manual for chemists - Academic Press, New York, 1960.
- (2) L. FARBER en A. CEDERQUIST - The determination of volatile reducing substances as an aid in quality control of fish products - Food Technology, 7, 478, 1953.
- (3) L. FARBER en M. FERRO - Volatile reducing substances and volatile nitrogen compounds in relation to spoilage in canned fish - Food Technology, 10, 303, 1956.
- (4) L. FARBER en P. LERKE - A review of the value of volatile reducing substances for the chemical assessment of fish and fish products - Food Technology, 12, 677, 1958.
- (5) L. FARBER en P. LERKE - Studies on the evaluation of freshness and on the estimation of the storage life of raw fishery products - Food Technology, 15, 191, 1961.
- (6) L. FARBER - Quality evaluation studies of fish and shellfish from certain northern European Waters - Food Technology, 17, 476, 1963.
- (7) L. FARBER - Review of the VRS method for the determination of spoilage in fish - in : The technology of fish utilization, F.A.O., Rome, 1965.
- (8) L. FARBER - Freshness tests - in : Fish as food, Vol. 4, Uitgegeven door G. Borgström, Academic Press, New York, 1965.
- (9) E. HESS - A test to estimate the keeping quality of fresh fish - Progress Reports of the Atlantic Coast Stations, Fisheries Research Board of Canada, nr 30, 10, 1941.
- (10) J. HOLLUTA - Zeitschrift für Physik und Chemie, 102, (32), 276, 1922.
- (11) M. KAREL, B. PROCTOR en A. CORNELL - Flavor permeability in food packaging and its evaluation - Food Technology, 11, 141, 1957.

- (12) O. LANG, L. FARBER, C. BECK en F. YERMAN - Determination of spoilage in protein foodstuffs, with particular reference to fish - Industrial and Engineering Chemistry (Anal. Ed.), 16, 490, 1944.
- (13) M. MOORJANI, J. IYENGAR, K. VISWEZWARIAH, D. BHATIA en V. SUBRAKMANYAN - Changes in the total volatile bases, volatile reducing substances and bacterial count as indices of fresh water fish spoilage - Food Technology, 12, 385, 1958.
- (14) R. RIEMANN - Post-mortem-forandringer i fisker - Den danske dyrlaegeforenings medlemsblad, nr 11, 1, 1952.
- (15) P. SCHMIDT en H. MAYOH - The "volatile reducing substances" test for fish freshness - Progress Reports of the Pacific Coast Stations, Fisheries Research Board of Canada, nr 102, 22, 1955.
- (16) J. SHEWAN, Torry Research Station, Aberdeen, Schotland - Persoonlijke mededeling.
- (17) M. STANSBY, R. VAN CLEVE en J. STERN - Review of objective tests for fish freshness - Seattle Contract Report, U.S.D.I., Bureau of Commercial Fisheries, 1957.
- (18) R. STROHECKER, R. VANBEL en H. KIRCHBERG - Eine auf neuer Grundlage beruhende Methode zur Bestimmung der Verdorbenheit von Fleisch, Fisch und Fett - Zeitschrift für Analytische Chemie, 110, 1, 1937.
- (19) T. SUZUKI - A new method for determination of volatile reducing substance (VRS-value) and its application - Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 26, 70, 1959.
- (20) H. TARR - Rise and fall of bacterial populations in fish muscle - Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 6, 119, 1943.
- (21) E. VAISEY - Chemical changes in nitrite-treated cod fillets in relation to spoilage assessment - Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 13, 559, 1956.

- (22) N. VELANKAR - Volatile reducing substances in assessment of fish spoilage - Indian Journal of Technology - 2, 247, 1964.
- (23) W. VYNCKE - De objektieve kwaliteitsbepaling van vis - Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij, Oostende, publikatie nr 5, 1964.
- (24) W. VYNCKE - Vergleichende Versuche mit dem "Intelectron Fish Tester V" und mit konventionellen Laboratoriums Frische-testen - Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 62, (2), 46, 1966.
- (25) W. VYNCKE - De objektieve kwaliteitsbepaling van vis ; II. Vergelijkend laboratoriumonderzoek - Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij, Oostende, publikatie nr 8, 1965.
- (26) W. VYNCKE - De invloed van de temperatuur en de objektieve kwaliteitsbepaling van vis - Ministerie van Landbouw, Proefstation voor Zeevisserij, Oostende, publikatie nr 12, 1966.
- (27) H. WITTFOGEL - Die Bestimmung von fluchtigen reduzierenden Substanzen als ein Hilfsmittel für eine objektive Beurteilung von dem Frischezustand der Seefischen - Archiv für Lebensmittelhygiene, 7, 4, 1956, 7, 51, 1956 en 7, 111, 1956.
- (28) H. WITTFOGEL en R. GEBHARDT - Ueber die Bestimmung flüchtiger reduzierenden Substanzen als Hilfsmittel für die objektive Beurteilung des Frischezustandes von Seefischen - Archiv für Lebensmittelhygiene, 8, 241, 1957 en 8, 270, 1957.

Oktober 1966.

